

⑫ 公開特許公報(A)

平3-92756

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)4月17日

G 01 N 27/447
21/78
33/58ZNA C
A7055-2G
7055-2G
7235-2G

G 01 N 27/26 3 2 5 E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全6頁)

⑭ 発明の名称 DNA塩基配列決定装置

⑯ 特 願 平1-229149

⑰ 出 願 平1(1989)9月6日

⑱ 発 明 者 平 林 集 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑲ 発 明 者 神 原 秀 記 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑳ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉑ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

DNA塩基配列決定装置

2. 特許請求の範囲

1. 励起光源、電気泳動ゲル部、蛍光検出部およびデーター処理部を有する電気泳動分離を用いたDNA塩基配列決定装置において、上記蛍光検出部に光ファイバーやバンドル光ファイバー等のライトガイドを用いて、その入口端面を発光する蛍光標識DNA試料断片群が形成する立体に接するあるいはそれに近い状態にすることによりレンズ等を用いずに直接集光することを特徴とするDNA塩基配列決定装置。

2. 上記検出部にミラーを併用することを特徴とするDNA塩基配列決定装置。

3. 上記観測部をゲル保持板の固定持具と一体化することを特徴とするDNA塩基配列決定装置。

4. 末端塩基種が異なる4種のDNA断片群を発光波長の異なる蛍光体で標識し同一泳動路を泳動させる多色蛍光方式の場合、上記検出部にお

(1)

いて、1泳動路あたりに複数本の光ファイバーを用いて集光すると共に光路分割することを経験とするDNA塩基配列決定装置。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は遺伝子上の塩基配列決定装置に関する。

〔従来の技術〕

蛍光検出DNA型塩基配列決定装置において、ライトガイドを用いたものとしては、例えばジャーナル オブ バイオケミカル アンド、バイオフィジイカル メソッズ 第13巻(1986年)第315頁から第323頁(Journal of Biochemical and Biophysical Methods 13, 315 (1986))が挙げられる。この例では、光励起された蛍光標識DNA断片群からの蛍光をレンズを用いてライトガイド入口に集光している。

〔発明が解決しようとする課題〕

微量DNAの塩基配列決定を実現させるためには、蛍光検出部の感度を増大させることが要求される。そのためには、光電変換部における感度の

(2)

増大と蛍光検出部での蛍光観測に対する実質的な立体角 Ω の増大によるしかない。以下では前者については述べない。

後者に対しては、従来技術では十分な配慮がなされていない。即ち、従来方式の蛍光検出部では、光励起された蛍光標識DNA断片群からの蛍光をレンズを用いてライトガイド上に集光させていたために、 $\Omega/4\pi \lesssim 10^{-4}$ 程度であった。

本発明の目的は、蛍光観測に対する実質的な立体角を増大させることにより蛍光検出部の感度を増大させることにある。

本発明の他の目的は、多色蛍光方式の場合に蛍光の波長分離を行なうための光路の分離を簡便化することにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的を達成するために、本発明はライトガイドの入口端面を発光する蛍光標識DNA試料断片群に極力接近させるようにしたものである。

上記他の目的を達成するために、4の倍数といたった複数本からなる光ファイバーを同一泳動路に

(3)

光体は第6図に示した三角形OABの内側に存在する必要がある。具体的にはライトガイド6の入口のゲル泳動方向の長さが、励起用光ビームの直径より大きいことと、ライトガイド6の入口を、発光する蛍光標識DNA試料断片群にできるだけ近づけておくことが必要である。

ライトガイドに光ファイバーを複数本組み合わせた場合は、光ファイバー間のすき間のためにライトガイド入口端面における受光できる面積は減少する(第3図参照)。

即ち、上記(1)式における観測される蛍光強度 I は減少する。その効果を上式右辺の a で表わすと、 a の値はライトガイドの形状に依存するが、実際にはせいぜい 10^{-1} 程度である。従つて、本発明によれば、従来のレンズを用いて集光する場合に比べて、観測される光量を10倍以上増加させることができる。

〔実施例〕

(実施例1)

第1図は本発明の一実施例に基づく蛍光標識

(5)

並べるようにしたものである。

〔作用〕

等方的な蛍光に対する観測される蛍光強度は、次式で与えられる。

$$I = \frac{\Omega}{4\pi} h\nu ANV \cdot a \quad \dots (1)$$

ここで、 $h\nu$ は光子のエネルギー、 A は光学遷移確率、 N は励起分子密度、 V は励起分子の存在する立体の体積、 a は補正項である。ある立体角 Ω 内に放出される蛍光強度がそのまま減少せずに観測される場合は $a=1$ とする。

第6図にはライトガイド6の入口部の断面及び発光する蛍光標識DNA試料断片群の断面を示す。後者は励起用光ビームの断面に一致する。ライトガイド6が効率よく光を伝達できるための光の取り込み立体角がこの場合の観測する立体角 Ω に対応する。開口数0.3のライトガイドを用いた場合は、 $\Omega/4\pi \approx 10^{-1}$ となり、従来のレンズを用いて集光する方式に比較して立体角は約 10^2 倍大きくなる。ただし、立体角 Ω で観測される発

(4)

DNA塩基配列決定装置を示す図である。装置の構成は、ゲル保持板1、分離用ゲル2、パンプアーク3、励起用レーザー4、反射ミラー5、ライトガイド6、固定器具7、フィルター8、受光部9、フレームメモリ10、計算機11、出力機器12からなる。

様々な部位で切断された末端塩基の異なる4種のDNA断片群を蛍光波長の異なる蛍光体で標識された蛍光標識DNA試料断片群は、分離用ゲル2上部に注入される。分離用ゲル2には泳動方向に電場が印加されている。そのため、蛍光標識DNA試料断片群は下方に向つて泳動し、断片の長さに応じて分離されて、DNAバンド13を形成する。レーザー光の照射される領域に達したDNAバンドのみが、光励起され蛍光を発する。ライトガイド6に入射した蛍光はフィルター8により波長分離されたあと受光部9で光電変換される。即ち、受光部では蛍光強度の時間的な変化が各々の末端塩基に対して得られる。それらを一組フレームメモリ10に記憶させて、計算機11によ

(6)

り試料DNAの塩基配列を決定する。

第2図には、光励起される領域付近の拡大図を示す。分離用ゲル2から出てバッファー槽3に入つて直後のDNAバンドをレーザー光照射により検出する。レーザー光照射部はバッファー液に満たされている。分離用ゲル2中で光検出する場合と比較すると、ゲルからの蛍光がバックラウンドノイズとして観測されるのを避けることができるほか、レーザー光の入射位置を確実に固定することができる。レーザービームの断面は必ずしも円形である必要はなく、DNAバンドの泳動方向に0.2mm程度にしばつてあればよい。

光励起された蛍光標識DNA試料断片は蛍光を空間的に等方的に発すると考えることができるので、第2図に示すようにミラーを取り付けると観測される蛍光強度は増加する。また、ミラーのある位置に別のライトガイド入口端面を設置してもよい。ゲル保持板と蛍光検出部は分離することができる。

第3図に、一泳動路あたりに4本の光ファイバ
(7)

から観測するが、下方向から観測することもできる。その例を第4図に示す。

同一の蛍色体で標識した末端塩基の異なるDNA試料断片を別々の泳動路で泳動する場合は充分な受光面積を確保するために泳動路幅程度の直径の光ファイバを用いるのが望ましいが、例えば第3図(b)に示すように泳動路幅の約二分の一のコア径の光ファイバを2本用いることもできる。第3図(b)では、泳動路幅1.5mm、レーザービーム径0.2mm、ファイバコア径0.8mm、クラッド径0.88mmの例を示すが、光ファイバ間のすき間による受光面積のロスは約6%以下である。(実施例2)

第5図では、ゲル中を泳動中の蛍光標識DNA試料断片群を観測する例を示す。この実施例では実施例1と比べて観測領域におけるDNAバンドの広がりや泳動速度の変化がないのが特徴である。(発明の効果)

本発明は、以上説明したように構成されているので、以下に記載されるような効果を奏する。

(9)

ーで構成されたライトガイドを使用した例を示す。DNAバンドの幅はレーザービーム径よりも大きいので、DNAバンドの中のレーザー光が照射している領域でのみ光励起がなされ、蛍光を発する。従つて、蛍光は泳動路の幅とレーザービームの直径により制限された空間で発する。第3図(a)の例では、泳動路幅1.5mm、レーザービーム径0.2mmの場合におけるコア径0.3mm、クラッド径0.33mmの光ファイバを用いている。ファイバは固定持具7に固定されている。

断面が0.2mm×1.5mmのライトガイドを用いた場合に比べると、この例では光ファイバ間のすき間のために受光面積が約70%となる。蛍光標識DNAからの蛍光はDNA末端塩基に応じて蛍光のピーク波長が異なる。4本の光ファイバの出口にはそれぞれ特定の末端塩基からの蛍光のみを透過するフィルター8を密着させてあり、上記フィルターで波長分離された蛍光は受光部9の二次元検出器により検出される。

第2図の例では発光するDNAバンドを横方向
(8)

ライトガイドの入口端面を発光する蛍光標識DNA試料断片群に密着させることにより、観測できる立体角が増し、装置としての蛍光検出感度を従来比10倍程度もしくはそれ以上に高くできる。また、ミラーを用いることにより蛍光検出感度は最大2倍になる。また、ライトガイド入口がゲル保持板の固定持具と一体化されるため、レンズ等を用いる場合に比較して構造が単純でスペースをとらない。多色蛍光方式の場合に、光路の分離が容易である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例の見取り図、第2図は第1図の蛍光検出部のII-II線断面図と見取り図、第3図は一泳動路に対する蛍光検出部の入口と発光するDNAバンドの大きさの相対関係を示す図、第4図は泳動ゲルの下方から観測する装置の実施例の蛍光検出部の断面図および見取り図、第5図は泳動中のDNAバンドを泳動ゲル側面から観測する実施例の装置の蛍光検出部の断面図および見取り図、第6図はDNAバンドの断面とラ

(10)

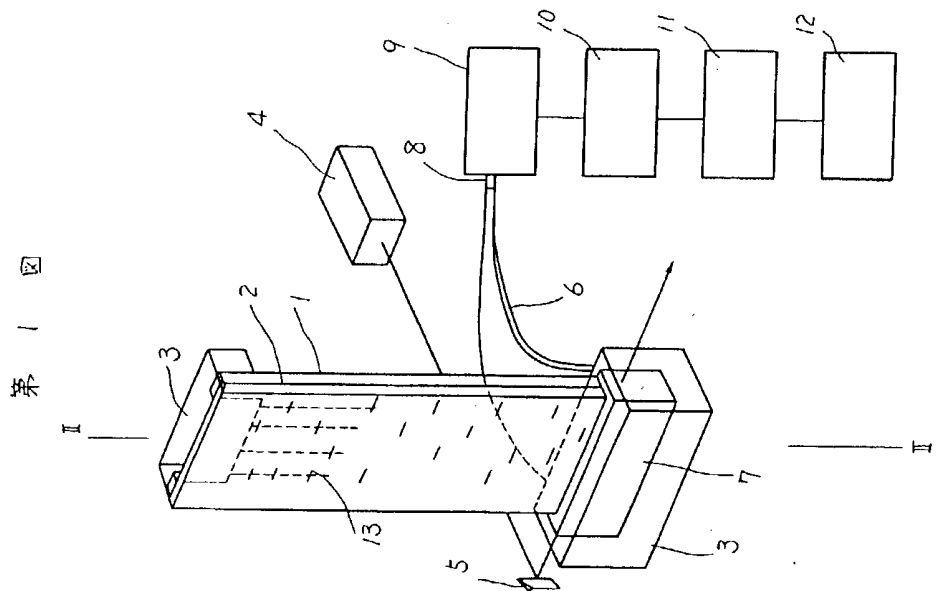
イトガイド入口との関係を示す説明図である。

1…ゲル保持板、2…分離用ゲル、3…バツファ一槽、4…励起用レーザー、5…反射ミラー、6…ライトガイド、7…固定持具、8…フィルター、9…受光部、10…フレームメモリ、11…計算機、12…出力機器、13…レーザービーム断面、14…光ファイバー（コア）、15…光ファイバー（クラッド）、16…発光するDNAバンド。

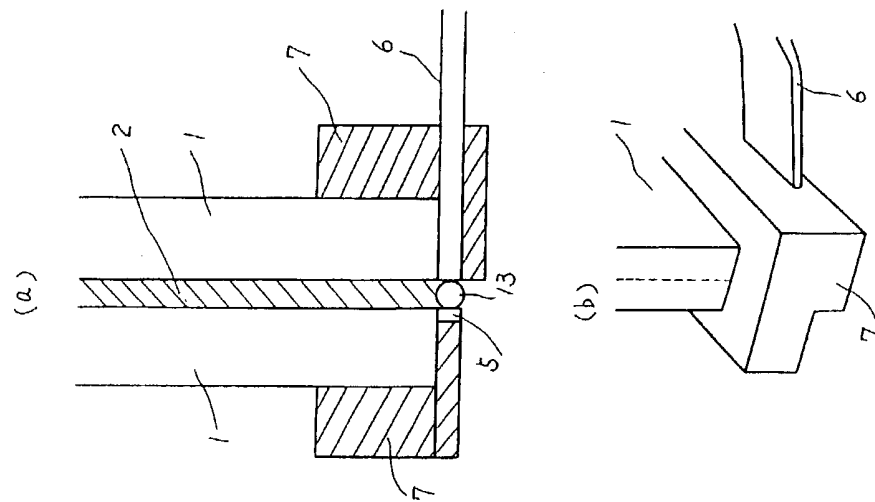
代理人 弁理士 小川勝男



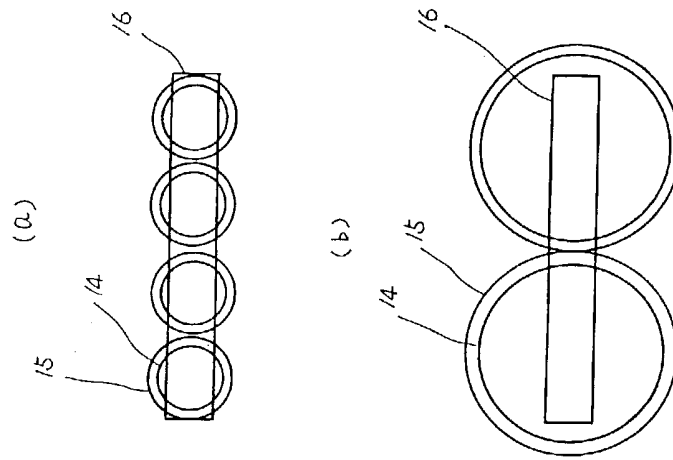
(11)



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖

